

AA

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
3 janvier 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/00872 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/00, 9/16, C07K 7/06, 14/47, C12Q 1/68

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/02058

(22) Date de dépôt international : 28 juin 2001 (28.06.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/08407 29 juin 2000 (29.06.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : EXON-
HIT THERAPEUTICS SA [FR/FR]; 63-65, boulevard
Masséna, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : AÏT
IKHLEF, Ali [FR/FR]; 17, avenue de Choisy, F-94140
Alfortville (FR). RESINK, Annelies [NL/FR]; 48, rue
Bobillot, F-75013 Paris (FR). SCHWEIGHOFFER,
Fabien [FR/FR]; 38, avenue Paul Déroulède, F-94300
Vincennes (FR).

(74) Mandataire : BECKER, Philippe; Becker et Associés,
10, rue de Milan, F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING OR DETECTING DEGENERATIVE DISEASES OF THE MO-
TOR NEURONS

(54) Titre : COMPOSITIONS ET METHODES POUR LE TRAITEMENT OU LA DETECTION DE PATHOLOGIES NEURO-
DEGENERATIVES

(57) Abstract: The invention concerns the field of biology, genetics and medicine. In particular, it concerns novel methods for detecting, characterising and/or treating (or managing) degenerative diseases of the motor neurons, in particular amyotrophic lateral sclerosis. The invention also concerns methods for identifying or screening compounds active in said pathologies. The invention further concerns compounds, genes, cells, plasmids or compositions useful for implementing said methods. The invention finally concerns the part played by calcineurin in said pathologies and its use as therapeutic, diagnostic or experimental target.

(57) Abrégé : La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en oeuvre des méthodes ci-dessus. L'invention décrit notamment le rôle de calcineurine dans ces pathologies et son utilisation comme cible thérapeutique, diagnostique ou expérimentale.

WO 02/00872 A2

BEST AVAILABLE COPY

Compositions et méthodes pour le traitement ou la détection de pathologies
neurodégénératives

- La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies.
- L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus. L'invention décrit notamment le rôle de calcineurine dans ces pathologies et son utilisation comme cible thérapeutique, diagnostique ou expérimentale.
- De nombreuses pathologies neurodégénératives ont été décrites comme ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'excitotoxicité. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques et de la chorée de Huntington.
- La sclérose amyotrophique latérale (SAL ou ALS pour Amyotrophic Lateral Sclerosis) est une maladie neurodégénérative, associée à différents types d'inclusions tels les corps de Lewis et caractérisée par une apoptose des motoneurones spinaux et corticaux dont l'issue fatale est parfois associée à une démence frontale. Des formes sporadiques, sans aucune mutation décrite, coexistent avec des formes familiales (FALS) associées à des mutations dans le gène SOD1 codant pour la superoxyde dismutase. La majorité des cas est sporadique, les formes familiales (FALS) étant très rares. Il est vraisemblable qu'une longue période asymptomatique précède l'apparition des symptômes cliniques qui sont variés et dont la classification est complexe. Les futurs développements thérapeutiques substitueront aux traitements de la symptomatologie des stratégies basées sur les causes moléculaires de la pathologie. Au niveau cellulaire, ces symptômes sont associés à une mort des

motoneurones corticaux et des motoneurones spinaux. Cette mort neuronale a été reliée à différents phénomènes qui constituent la base de plusieurs pathologies neurodégénératives. C'est le cas de l'excitotoxicité liée au glutamate, du stress oxydatif, d'une certaine auto immunité dirigée contre des marqueurs neuronaux (les canaux calciques dans le cas de l'ALS) ainsi que d'anomalies du cytosquelette. Si ces phénomènes sont décrits, la ou les causes de ces maladies, dont l'ALS, sont obscures. Même si les FALS sont liées à des mutations dans le gène SOD1 qui code pour la superoxyde dismutase, les mécanismes qui engagent les neurones vers la mort cellulaire dont au moins une composante est l'apoptose sont inconnus.

Identifier les événements moléculaires impliqués dans les différents phénomènes impliqués dans la mort cellulaire permettra de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'étude de ces événements est difficilement réalisable à partir de biopsies humaines. Ces biopsies proviennent évidemment d'échantillons post-mortem dont la qualité est difficilement contrôlable et ne représentent que des états pathologiques représentatifs des phases tardives de la maladie.

Les modèles animaux donnent accès à des échantillons biologiques qui permettent d'analyser différentes étapes du développement d'une pathologie et de comparer ces étapes à des témoins sains. A cet égard, des souris transgéniques qui expriment le gène humain SOD1 portant l'une des mutations qui prévaut dans les FALS (mutation G93A) sont disponibles auprès de Jackson Laboratory, sous condition de prise d'une licence d'utilisation auprès de la NorthWestern University. Ce modèle reproduit en 120 jours l'issue fatale de la maladie avec des symptômes comparables à ceux de la maladie humaine. L'apparition des symptômes d'ALS liés à la mutation G93A dans SOD1 n'est pas la conséquence d'une réduction de l'activité superoxyde dismutase mais d'un gain de fonction qui augmente la capacité de l'enzyme à générer des radicaux libres. Malgré ces informations, les événements moléculaires qui président aux différentes étapes de l'ALS sont mal connus. La complexité de

ces événements moléculaires reflète l'évolution de la pathologie : Dans le modèle transgénique étudié, aucune dérégulation neuronale ou manifestation clinique n'a été rapportée à 30 jours. 60 jours correspondent à un stade qui précède de peu les premiers symptômes, mais qui est déjà caractérisé au niveau cérébral par des changements dans la physiologie cellulaire tels qu'une altération du métabolisme mitochondrial, un stress et une mort neuronale associés à un phénomène d'excitotoxicité. A 90 jours, 50% des motoneurones corticaux et spinaux sont morts et un processus actif d'apoptose neuronale est engagé parallèlement à une activation astrocytaire. Le phénomène d'excitotoxicité n'est plus observé à ce stade. La mort neuronale y est associée à l'activation de caspases qui ne semblent pas impliquées dans les phases précoces de la pathologie.

Identifier les différents événements moléculaires spécifiques des différentes phases de la pathologie doit permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques aussi bien que de nouveaux marqueurs diagnostiques. L'une des approches les plus efficaces pour réaliser cette identification consiste à identifier les gènes et les protéines dont l'expression caractérise un état physiopathologique.

La présente invention décrit à présent l'identification d'événements génétiques impliqués dans les phénomènes d'excitotoxicité et de mort neuronale. La présente invention fournit ainsi de nouvelles approches thérapeutiques et diagnostiques des pathologies associées à ces phénomènes, ainsi que de nouvelles cibles pour l'identification de composés actifs.

Plus particulièrement, une analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN extraits d'échantillons de cerveau et de moelle épinière sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum d'événements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie. Cette analyse a été effectuée par criblage différentiel qualitatif selon la

technique DATAS (décrite dans la demande n° WO99/46403), qui présente des avantages inégalés.

La présente demande de brevet découle notamment de la construction par la
5 demanderesse d'un répertoire des altérations d'épissage dans le cerveau des
animaux modèles de l'ALS âgés de 60 jours. Ce répertoire qui contient plus de
200 séquences distinctes, implique des acteurs clés du phénomène
d'excitotoxicité tels que les canaux potassiques et le récepteur NMDA. Des
séquences dérivées d'ARNs codant pour des protéines impliquées dans la
10 réponse au stress, dont des protéines de choc thermique, font également partie
de ce répertoire, soulignant l'implication de cette réponse dans les phases
précoces de l'ALS. Une altération du métabolisme énergétique apparaît
clairement affecter les motoneurones corticaux des animaux qui développent la
pathologie. Par exemple, l'intron 6 de la forme mitochondriale de la créatine
15 kinase est isolé spécifiquement à partir des ARN messagers exprimés en
conditions pathologiques chez les animaux âgés de 60 jours. Cette interruption
de la séquence codante par cette rétention d'intron aboutit à un ARN-messager
qui code pour une forme inactive de l'enzyme. Cette observation est en accord
avec les observations biochimiques qui ont montré une diminution de l'activité
20 créatine kinase mitochondriale corrélée avec une diminution de la quantité de
cette enzyme dans les neurones des animaux du même modèle transgénique.
La spécificité des séquences qui constituent ce répertoire est attestée par le fait
que la même analyse différentielle qualitative de l'expression génétique réalisée
sur des animaux âgés de 90 jours aboutit à un répertoire différent dont sont
25 absents notamment les différents marqueurs de l'excitotoxicité. L'analyse des
modifications d'épissage confirme que les événements moléculaires sont
différents selon le stade de la pathologie.

La réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques
30 âgés de 60 jours a permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de la
sous-unité catalytique de la calcineurine. Ce fragment correspond à un fragment
d'exon spécifiquement présent dans les animaux contrôles et donc

spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment recouvre les nucléotides 1 348 à 1 579 référencés à partir de l'ATG. Cette région est essentiellement codante et contient un domaine auto-inhibiteur de l'enzyme situé à l'extrémité C-terminale de l'enzyme. Par des expériences de RT PCR, une nouvelle isoforme de la sous-unité catalytique de la calcineurine a été mise en évidence. Cette isoforme courte se distingue de la forme longue par une délétion des nucléotides 1341 à 1741 (inclus) et par conséquent des acides aminés 447 à 524, le codon stop de la calcineurine correspondant au nucléotide 1641 (la séquence complète de la calcineurine et son ADN, d'origine murine ou humaine, est disponible sur banque de données, notamment GeneBank). La séquence d'ADN codant la calcineurine humaine (2 119 pb) est représentée sur la séquence SEQ ID n° 1. La séquence protéique est représentée sur la séquence SEQ ID n° 2. Les résidus 348 à 368 de SEQ ID n° 2 correspondent au domaine de liaison à la calcineurine Béta, les résidus 391 à 414 au domaine de liaison à la calmoduline et les résidus 467 à 490 au domaine auto-inhibiteur. Les séquences SEQ ID n° 3 et 4 représentent, respectivement, la séquence nucléique et la séquence en acides aminés du variant d'épissage de la calcineurine, selon l'invention. La délétion des résidus nucléiques 1341 à 1741 inclus entraîne une délétion des acides aminés C-terminaux à compter du résidu 447, et la création d'une extrémité C-terminale de séquence KLYFGEGGD (résidus 448 à 456 de SEQ ID n° 4).

Des expériences de mutagenèse et de délétions ont montré que le domaine auto-inhibiteur de la calcineurine correspond aux acides aminés 467 à 490 et que l'absence de ce domaine aboutit à une activation constitutive de la calcineurine. La calcineurine est impliquée dans le relais des voies de signalisation qui dépendent du calcium et de la calmoduline. L'interaction de la calmoduline avec la calcineurine stimule l'activité de cette dernière. La délétion du domaine auto-inhibiteur de la calcineurine augmente le niveau basal d'activité de cette enzyme mais la maintient susceptible à l'activation par la calmoduline.

La présente invention décrit donc un événement moléculaire original et nouveau (un épissage), qui aboutit à une activation constitutive de la calcineurine et qui est corrélé au phénomène d'excitotoxicité et/ou de mort neuronale. L'invention montre également, pour la première fois, qu'une activation constitutive de la calcineurine est associée aux stades précoces de l'ALS. La calcineurine constitue donc une cible thérapeutique nouvelle et importante dans le développement de thérapeutiques de ces pathologies, utilisables notamment à des phases précoces de leur développement, et s'adressant aux véritables bases moléculaires de la pathologie et non aux symptômes ou composantes immunitaires associées.

Un premier objet de l'invention réside plus particulièrement dans l'utilisation d'un acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée de l'ARN messager de la sous-unité catalytique de la calcineurine pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou de détection d'une situation de stress neuronal et plus particulièrement la situation d'excitotoxicité.

L'invention réside, généralement, dans l'utilisation d'un acide nucléique complémentaire de tout ou partie du gène ou du messager de la calcineurine, pour la détection d'événements pathologiques de type excitotoxicité, stress ou mort neuronale, etc. L'invention est particulièrement destinée à la détection, au dépistage, au diagnostic ou à la caractérisation d'une excitotoxicité associée aux formes précoces de maladies neurodégénératives, notamment de l'ALS, de la maladie de Parkinson ou de la maladie d'Alzheimer.

Il s'agit plus particulièrement d'acides nucléiques capables de mettre en évidence une forme délétée de l'ARNm de la calcineurine, notamment un variant d'épissage, en particulier, dans lequel un domaine auto-inhibiteur est délété, en particulier les bases 1341 à 1741 (ou la région correspondante du gène ou ADN humain).

L'invention montre en effet l'existence d'événements d'épissage affectant le gène de la calcineurine, associés au développement de l'excitotoxicité neuronale, et propose des méthodes de détection ou dépistage de dysfonctionnements basés sur la mise en évidence de la présence de ces formes épissées dans des échantillons biologiques.

Avantageusement, l'acide nucléique comprend tout ou partie de la séquence codant le domaine auto-inhibiteur de la calcineurine (compris entre les nucléotides 1401 et 1503 à partir de l'ATG, pour la forme murine, ou des résidus homologues dans la séquence humaine, par exemple les acides aminés 467-490 de la séquence SEQ ID NO :2), ou de la séquence résultant de la jonction entre les régions non délétées, ou une séquence complémentaire de celles-ci.

Selon des modes particuliers de mise en œuvre, l'invention utilise un acide nucléique complémentaire d'une région comprise dans une séquence suivante :

- résidus 1341 à 1741 de SEQ ID n° 1
- résidus 1333 à 1347 de SEQ ID n° 3.

La complémentarité est, de préférence parfaite, pour assurer une meilleure spécificité d'hybridation. Toutefois, il est entendu que certains mésappariements peuvent être tolérés. L'acide nucléique utilisé pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus peut être un ADN ou un ARN, de préférence un ADN d'origine synthétique. Il comporte de préférence de 10 à 500 bases, typiquement de 10 à 100 bases. Il est entendu qu'un acide nucléique plus long peut être utilisé, si désiré, bien que cela ne soit pas préféré. L'acide nucléique est avantageusement un ADN simple brin, de 10 à 500 bases, complémentaire d'une région au moins de la séquence codant le domaine auto-inhibiteur de la calcineurine ou de la séquence résultant d'un épissage affectant au moins une partie de ce domaine. L'acide nucléique peut être marqué, par exemple par voie radioactive, enzymatique, luminescente, fluorescente, chimique, etc.

Pour la mise en œuvre des méthodes selon l'invention, on met en contact in vitro un échantillon biologique d'un sujet, contenant un acide nucléique, avec un acide nucléique tel que défini ci-dessus, et on détecte la formation d'un hybride. L'échantillon biologique peut être un échantillon de sang, de fluide, de cellule, de tissu, etc. L'acide nucléique peut être immobilisé sur un support, de type verre, silice, nylon, etc.

L'invention concerne également des méthodes de détection, dosage, dépistage, diagnostic, etc. in vitro, utilisant un anticorps spécifique d'une forme épissée de la calcineurine, par exemple un anticorps spécifique de la région polypeptidique KLYFGEGGD. Comme indiqué ci-avant, ce domaine est spécifique d'une forme nouvelle de calcineurine et n'existe pas dans la calcineurine de type sauvage. Des anticorps dirigés contre ce domaine permettent donc de mettre en évidence, par des méthodes immunologiques classiques, la présence d'un variant d'épissage et donc d'une prédisposition ou de l'initiation d'un phénomène d'excitotoxicité neuronale.

Les anticorps peuvent être préparés par tout technique connue de l'homme du métier.

Un objet de l'invention réside également dans un anticorps liant un polypeptide de séquence SEQ ID NO :4. La liaison est préférentiellement une liaison sélective, l'anticorps ne reconnaissant pas de manière spécifique la calcineurine de séquence SEQ ID NO :2. Un autre objet de l'invention réside dans un anticorps capable de lier la séquence KLYFGEGGD. Un autre objet de l'invention est un anticorps produit par immunisation avec un polypeptide comprenant la séquence KLYFGEGGD ou un fragment immunogène de celle-ci.

Les anticorps peuvent être polyclonaux ou monoclonaux. Il peut également s'agir de fragments ou dérivés de tels anticorps, en particulier de fragments ou dérivés de tels anticorps ayant la même spécificité antigénique, comme par exemple des fragments Fab, Fab'2, CDR, des anticorps humanisés, des

anticorps simple-chaîne (ScFv), etc. Les anticorps peuvent être produits de manière conventionnelle, par immunisation avec un polypeptide tel que défini ci-avant, et récupération du sérum (polyclonal) ou des cellules de la rate (pour fabriquer des hybridomes par fusion avec une lignée appropriée).

Des méthodes de production d'anticorps polyclonaux chez différentes espèces ont été décrites par exemple dans Vaitukaitis et al., (1971) J Clin-Endocrinol Metab. 33(6): 988-91. En bref, l'antigène est combiné avec un adjuvant (e.g. Freund's) et injecté, par exemple par voie sous-cutanée, à un animal. Des échantillons de sang sont collectés et les anticorps sont séparés.

Pour la production d'anticorps monoclonaux, on peut se référer par exemple à Harlow et al (Antibodies: A laboratory Manual, CSH Press, 1988), à Kohler et al (Nature 256 (1975) 495), ou à Ward et al (Nature 341 (1989) 544), incorporés à la présente par référence. Les fragments Fab ou F(ab')₂ peuvent être produits par exemple selon Riechmann et al., 1988, Nature 332, 323-327.

Les anticorps selon l'invention peuvent être couplés à différents groupes hétérologues, tels que des marqueurs, des toxines des agents thérapeutiques, etc. Des exemples de toxine sont la toxine diphtérique ou botulique, des exemples d'agents thérapeutiques sont des cytokines, facteurs de croissance, facteurs trophiques, etc. Les anticorps de l'invention peuvent être utilisés en diagnostic ou en thérapeutique, ainsi que pour la purification de l'antigène. Ils peuvent également servir pour le screening de composés actifs.

L'invention est applicable au diagnostic ou la détection de différentes pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques, la chorée de Huntington ou l'ischémie cérébrale. Elle peut être utilisée pour la détection précoce, la mise en évidence d'une prédisposition, le choix et l'adaptation d'un traitement, le suivi de l'évolution de la pathologie, etc. Elle est particulièrement adaptée à la détection à un stade précoce de la sclérose en plaques.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé capable d'inhiber ou de réduire l'expression ou l'activité de la calcineurine, pour la préparation d'une composition destinée au traitement des maladies neurodégénératives, notamment en phase précoce, plus préférentiellement pour réduire l'excitotoxicité neuronale précoce associée aux maladies neurodégénératives telles l'ALS, Alzheimer ou Parkinson.

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, amélioration de la durée de vie, ralentissement de la progression de la maladie), etc. Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements, notamment adressant les événements tardifs de la pathologie, tels que des inhibiteurs de caspases ou autres composés actifs.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé capable d'inhiber (de préférence de manière sélective) l'expression ou l'activité de la calcineurine de séquence SEQ ID n° 4 pour la préparation d'une composition destinée à réduire l'excitotoxicité neuronale.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé est un acide nucléique anti-sens, capable d'inhiber la transcription du gène de la calcineurine ou la traduction du messenger correspondant. L'acide nucléique anti-sens peut comprendre tout ou partie de la séquence du gène de la calcineurine, d'un fragment de celle-ci, du messenger de la calcineurine, ou d'une séquence complémentaire à celles-ci. L'antisens peut notamment comprendre une région complémentaire de la forme d'épissage identifiée, et inhiber (ou réduire) sa traduction en protéine. Cet antisens comprend ainsi, à titre d'exemple, une séquence complémentaire aux nucléotides 1333 à 1347 de SEQ ID n° 3.

Selon un autre mode de réalisation, le composé est un peptide ou un anticorps spécifique d'une forme épissée de la calcineurine. Il peut s'agir notamment d'un peptide comprenant la séquence KLYFGEGGD ou d'un anticorps spécifique de

la protéine de séquence SEQ ID n° 4, et ne reconnaissant pas la protéine SEQ ID n° 2.

Selon un autre mode de réalisation, le composé est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique, notamment une molécule organique ou inorganique, d'origine végétale, bactérienne, virale, animale, eucaryote, synthétique ou semi-synthétique, capable de moduler l'expression ou l'activité de la calcineurine.

10 A titre d'exemple préféré, le composé est choisi parmi le FK506 et la cyclosporine A.

Un travail antérieur réalisé in vitro et in vitro à l'aide de lymphocytes T a montré que la superoxyde dismutase (SOD) protège la calcineurine de son inactivation, mais n'a pas du tout étendu ces observations à des modèles neuronaux. Au contraire, une étude plus récente menée sur des modèles de neurones a montré qu'une forme mutée de SOD1 qui correspond à une mutation retrouvée dans les formes familiales de l'ALS n'a pas un tel impact sur la calcineurine. De plus, cette étude documente le fait que dans ce système, les inhibiteurs de calcineurine comme le FK506 augmentent la mortalité cellulaire. Un lien direct entre ALS et augmentation de l'activité de la calcineurine, de même que toute possibilité d'intervention thérapeutique dans cette pathologie avec le FK506 ou tout autre inhibiteur de calcineurine sont donc exclus par ces enseignements.

25 Plusieurs inhibiteurs de la calcineurine ont été décrits dans l'art antérieur. Certains de ceux-ci sont des médicaments disponibles commercialement. C'est le cas du tacrolimus (ou FK506) et de la cyclosporine A. Ces deux composés sont des immuno-suppresseurs qui se lient à des immunophilines, respectivement la protéine FKBP12 (FK506 binding protein 12) et la cyclophiline A. L'inhibition de la calcineurine, lors de l'administration de ces composés, se fait par formation d'un complexe entre le composé, l'immunophiline qu'il cible et la sous-unité catalytique de la calcineurine. Ces immunophilines sont des

30

peptidyl-prolyl-cis/trans-rotamases dont l'activité est inhibée également par leurs ligands chimiques.

Certains rapports sont disponibles sur l'action neuroprotectrice de certains immunosuppresseurs in vitro. Les rapports les plus récents documentent que ces effets neuroprotecteurs, de même que les effets neurotrophiques de ces composés sont obtenus avec des immunophilines non immunosuppressives qui ont perdu la capacité d'inhiber la calcineurine. De même, les résultats obtenus chez l'animal en ischémie confirment les résultats in vitro. Ainsi, aucun effet significatif des composés cyclosporine A ou FK506 n'a été décrit en modèle animal de l'ALS ou chez des patients atteints de cette maladie. A notre connaissance aucun essai n'a été mené sur le modèle murin. Chez l'homme, aucun essai n'a été rapporté avec le FK506 et l'absence de résultats probants avec la cyclosporine est parfaitement compatible avec le fait que ce composé franchit mal la barrière hématoencéphalique (contrairement au FK506).

Aujourd'hui, il n'existe donc pas d'évidence selon laquelle l'inhibition de la calcineurine par le FK506 ou la cyclosporine A pourrait ralentir la progression de l'ALS. D'autre part, il est à souligner qu'aucune étude n'a été entreprise en pathologie humaine ou à l'aide d'un modèle animal pour tirer partie de la capacité du FK506 et de la cyclosporine A à inhiber l'activité de la calcineurine. Les différents essais, y compris ceux entrepris pour traiter les syndromes neurodégénératifs, tendaient à inhiber la composante immunitaire associée à ces pathologies.

25

La présente invention propose donc, pour la première fois, la calcineurine comme cible thérapeutique pour le traitement des événements moléculaires associés à l'excitotoxicité. Selon des modes de mise en œuvre particuliers, l'invention peut être utilisée pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce des maladies neurodégénératives. Elle est applicable notamment au traitement de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de

30

Parkinson, de la sclérose en plaques, de la chorée de Huntington ou de l'ischémie cérébrale.

L'invention concerne des méthodes de traitement de l'ALS comprenant l'administration à un sujet d'un composé inhibiteur tel que décrit ci-avant.

L'invention concerne également des méthodes pour réduire l'excitotoxicité neuronale comprenant l'administration à un sujet d'un composé inhibiteur tel que défini ci-avant.

L'invention concerne également des méthodes de traitement de l'ALS ou de l'excitotoxicité neuronale comprenant l'administration d'un composé inhibant sélectivement l'expression ou l'activité de la calcineurine de séquence SEQ ID n° 4.

De préférence, les méthodes de l'invention sont utilisées pour le traitement en phase précoce des maladies neurodégénératives.

L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, de préférence par injection, typiquement par voie intra-péritonéale, intra-cérébrale, intra-veineuse ou intra-artérielle. Ces doses injectées peuvent être adaptées par l'homme de l'art. Typiquement, de 0,01 mg à 100 mg / kg environ sont injectés, pour des composés inhibiteurs de nature chimique, tels le FK506. Pour des composés tels des anticorps, des doses de 1 mg à 100 mg peuvent être utilisées. Pour des composés nucléiques, les doses peuvent varier par exemple entre 0,01 mg et 100 mg par dose. Il est entendu que des injections répétées peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres agents actifs ou tout véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (e.g., tampons, solutions saline, isotonique, en présence d'agents stabilisants, etc.)

D'autres objets de l'invention résident dans :

. l'utilisation des composés ci-dessus pour le traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de l'ALS,

. l'utilisation de la cyclosporine A pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la calcineurine chez les patients atteints d'ALS, ou

. l'utilisation de FK506 pour la préparation d'une composition destinée à
inhiber l'activité de la calcineurine chez les patients atteints d'ALS.

D'autres objets de l'invention concernent des méthodes de sélection,
5 identification, ou caractérisation de composés actifs sur les pathologies
associées à l'excitotoxicité, ou au stress neuronal, comprenant la mise en
contact de composés tests avec une cellule exprimant un variant d'épissage de
la calcineurine dépourvu de domaine auto-inhibiteur, et la mise en évidence des
composés inhibant l'expression ou l'activité de cette protéine.

10

Les méthodes peuvent être mises en œuvre avec différentes populations
cellulaires, telles que des cellules primaires ou des lignées de cellules d'origine
mammifère (humaine, murine, etc.): On utilise avantageusement des cellules qui
n'expriment pas naturellement la calcineurine, transfectées avec un acide
15 nucléique codant le variant souhaité. De cette manière, la sélectivité de la
méthode est augmentée. On peut également utiliser des cellules encaryotes
inférieures (levure, etc.) ou des cellules procaryotes.

Les méthodes de screening peuvent également être réalisées en système
acellulaire, par mesure de la capacité de composés tests à lier le variant de
20 calcineurine souhaité.

Un autre objet de l'invention concerne un polypeptide dérivé de la calcineurine,
dépourvu du domaine auto-inhibiteur, en particulier des acides aminés 467-490,
de préférence 467-521. Ce polypeptide peut être d'origine variée, notamment
25 murine, humaine, synthétique ou semi-synthétique, etc. Un exemple spécifique
de tel polypeptide comprend la séquence SEQ ID n° 4 ou une région de ce
polypeptide comportant au moins les résidus 441 à 456.

Un autre objet de l'invention est un polypeptide comprenant la séquence
30 KLYFGEGGD (résidus 448-456 de SEQ ID NO : 4) ou un fragment immunogène
ce celui-ci, de préférence comportant au moins 5 acides aminés contigus.

Un autre objet de l'invention concerne tout acide nucléique codant un polypeptide tel que défini ci-dessus, les vecteurs le contenant, cellules recombinantes, et utilisations. Le vecteur peut-être un plasmide ou un vecteur viral, comme par exemple un vecteur dérivé d'un adénovirus, d'un rétrovirus (y compris un lentivirus), d'un AAV, d'un herpès-virus, etc. Le vecteur peut comprendre un promoteur assurant une expression constitutive ou régulée (e.g., inductible), ubiquitaire ou spécifique de tissus, forte ou faible. Il peut s'agir d'un promoteur d'un gène domestique (PGK, albumine, apolipoprotéine), d'un promoteur assurant une expression spécifique dans les cellules nerveuses (GFAP, etc.) ou d'un promoteur viral (CMV-IE, LTR-RSV, etc.).

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

15

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1:

Le composé FK506, mais pas le Riluzole protège les neurones primaires de granules cérébelleux contre l'excitotoxicité induite par NMDA/Sérine.

20

EXEMPLES

1. Identification d'un variant de la calcineurine

25

L'analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN poly adénylés (poly A+) extraits d'échantillons de cerveaux d'animaux correspondant aux différents stades, sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum d'évènements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie.

30

Les ARN poly A+ sont préparés selon des techniques connues de l'homme de métier. Il peut s'agir en particulier d'un traitement au moyen d'agents

chaotropiques tels que le thiocyanate de guanidium suivi d'une extraction des ARN totaux au moyen de solvants (phénol, chloroforme par exemple). De telles méthodes sont bien connues de l'homme du métier (voir Maniatis et al., Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162 (1987) 156), et peuvent être aisément
5 pratiquées en utilisant des kits disponibles dans le commerce. A partir de ces ARN-totaux, les ARN poly A+ sont préparés selon des méthodes classiques connues de l'homme de métier et proposées par des kits commerciaux.

Ces ARN poly A+ servent de matrice à des réactions de transcription inverse à l'aide de reverse transcriptase. Avantageusement sont utilisées des reverse
10 transcriptases dépourvues d'activité RNase H qui permettent d'obtenir des premiers brins d'ADN complémentaire de tailles supérieures à ceux obtenus avec des reverse transcriptases classiques. De telles préparations de reverse transcriptases sans activité RNase H sont disponibles commercialement.

Pour chaque point de la cinétique de développement de la pathologie (30 jours,
15 60 jours et 90 jours) les ARN poly A+ ainsi que les ADNc simple brins sont préparés à partir des animaux transgéniques (T) et des animaux contrôles syngéniques (C).

Conformément à la technique DATAS, pour chaque point de la cinétique sont réalisées des hybridations d'ARNm (C) avec des ADNc (T) et des hybridations
20 réciproques d'ARNm (T) avec des ADNc (C).

Ces hétéroduplex ARNm/ADNc sont ensuite purifiés selon les protocoles de la technique DATAS.

Les séquences d'ARN non appariées avec un ADN complémentaire sont libérées de ces hétéroduplex sous l'action de la RNase H, cette enzyme
25 dégradant les séquences d'ARN appariées. Ces séquences non appariées représentent les différences qualitatives qui existent entre des ARN par ailleurs homologues entre eux. Ces différences qualitatives peuvent être localisées n'importe où sur la séquence des ARN, aussi bien en 5', 3' ou à l'intérieur de la séquence et notamment dans la séquence codante. Selon leur localisation, ces
30 séquences peuvent être non seulement des modifications d'épissage mais également des conséquences de translocations ou de délétions.

Les séquences d'ARN représentant les différences qualitatives sont ensuite clonées selon les techniques connues de l'homme de métier et notamment celles décrites dans le brevet de la technique DATAS.

Ces séquences sont regroupées au sein de banques de cDNA qui constituent des banques qualitatives différentielles. Une de ces banques contient les exons et les introns spécifiques de la situation saine; les autres banques contiennent les événements d'épissage caractéristiques des conditions pathologiques.

L'expression différentielle des clones a été vérifiée par hybridation avec des sondes obtenues par reverse-transcription à partir d'ARN messagers extraits des différentes situations étudiées. Les clones hybridant de façon différentielle ont été retenus pour analyse ultérieure. Les séquences identifiées par DATAS correspondent à des introns et/ou à des exons exprimées de façon différentielle par épissage entre les situations pathologiques et la situation saine. Ces événements d'épissage peuvent être spécifiques d'une étape donnée du développement de la pathologie ou caractéristiques de l'état sain.

La comparaison de ces séquences avec les banques de données permet de classifier les informations obtenues et de proposer une sélection raisonnée des séquences selon leur intérêt diagnostique ou thérapeutique.

Cette étude a permis de mettre en évidence une nouvelle isoforme de la sous-unité catalytique de la calcineurine, spécifique des cellules (ou échantillons biologiques) pathologiques (SEQ ID NO : 3 et 4). Cette isoforme courte se distingue de la forme longue par une délétion des nucléotides 1341 à 1741 inclus et par conséquent des acides aminés 447 à 524, le codon stop de la calcineurine correspondant au nucléotide 1641.

2. L'administration de FK506 à des souris transgéniques modèles de l'ALS ralentit la progression de la pathologie.

Le composé est administré par voie intrapérinéale, à différentes doses, selon des protocoles connus de l'homme de métier et dérivés des protocoles utilisés

pour mettre à profit leurs propriétés immuno-suppressives, dès les animaux âgés de 45 jours.

Les résultats indiquent clairement que le résultat optimal est obtenu avec une dose de 1mg/kg injectée de façon quotidienne. Ce traitement permet d'obtenir
5 une prolongation de la survie de ces animaux de 20 jours, ce même décalage étant obtenu pour l'apparition des symptômes.

3. Le FK506 protège des cultures primaires de neurones contre l'excitotoxicité.

10

Des résultats obtenus in vitro sur cultures primaires de neurones montrent que le FK506 protège de l'excitotoxicité.

Le FK506 exerce ses actions en se liant à une immunophiline : la FKBP12.

Cette protéine est douée d'une activité rotamase qui est inhibée par le FK506.

15

D'autre part, la protéine FKBP12, lorsqu'elle est liée au FK506 acquiert la propriété d'inhiber l'activité de la calcineurine. L'implication de l'inhibition de la calcineurine dans la spécificité de cet effet est soulignée par le fait qu'un immuno-suppresseur qui agit sur les activités rotamases des immunophilines, la rapamycine, n'a aucun effet sur le modèle étudié.

20

Réalisation expérimentale :

Les cultures primaires de cellules granulaires de cervelet sont réalisées à partir de rats âgés de 6 à 8 jours. Après 9 jours de différenciation selon des procédures connues de l'homme de métier, ces cellules deviennent vulnérables aux acides aminés excitateurs.

25

A ce stade, l'excitotoxicité est réalisée en présence de 100µM de N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et de 10µM de D-sérine. Le pourcentage de toxicité est mesuré par test MTT selon les techniques bien connues et largement utilisées par l'homme de métier.

Les résultats sont présentés sur la figure 1.

30

Selon les conditions expérimentales retenues, 30 à 35% des neurones sont toxifiées. En présence de 0,1µM de FK506, les mêmes conditions n'induisent que 18% de toxicité. En d'autres termes, 0,1µM de FK506 protège de 50%

contre la toxicité induite par le traitement NMDA/Ser. A 1 μ M, le FK506 confère une protection de près de 80%. A des concentrations supérieures, comme à 10 μ M par exemple, la protection n'est pas plus importante, une toxicité propre aux fortes doses du FK506 se manifestant.

5 En comparaison, le riluzole qui est le seul composé enregistré dans le traitement de l'ALS n'est pas capable de protéger les neurones excitotoxifiés par traitement au NMDA/Ser.

D'autres aspects et applications de l'invention résident dans :

10

- l'utilisation de tout ou partie d'une séquence dérivée de l'ARN messager de la sous-unité catalytique de la calcineurine à des fins de diagnostic ou de dépistage ou de caractérisation de pathologies neurodégénératives ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'excitotoxicité, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques, la chorée de Huntington ou l'ischémie cérébrale,

15

- l'utilisation de tout fragment d'acide nucléique y compris des ARN anti-sens dans le but d'inhiber l'expression de la calcineurine chez les patients atteints de telles pathologies,

20

- l'utilisation de tout composé chimique, notamment de la cyclosporine A ou du composé FK506, ou de toute composition pharmaceutique les contenant, dans le but d'inhiber l'activité de la calcineurine chez les patients atteints de telles pathologies,

25

- l'utilisation de tout ou partie d'une séquence dérivée de l'ARN messager de la sous-unité catalytique de la calcineurine à des fins de caractérisation du tissu et de la situation ischémique

Revendications

1. Utilisation d'un acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée de l'ARN messager de la sous-unité catalytique de la calcineurine pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou de détection d'une situation de stress neuronal et plus particulièrement la situation d'excitotoxicité.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'acide nucléique comprend tout ou partie de la séquence codant le domaine auto-inhibiteur de la calcineurine, ou une séquence complémentaire de celle-ci.
3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'acide nucléique est complémentaire d'une forme délétée de l'ARNm de la calcineurine.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'acide nucléique comprend au moins les résidus 1 333 à 1 347 de SEQ ID n° 3 ou les résidus 1341 à 1741 de SEQ ID n° 1.
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, pour le diagnostic ou la détection de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de la chorée de Huntington ou de l'ischémie cérébrale.
6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, pour la détection à un stade précoce de la sclérose en plaques.
7. Utilisation d'un composé capable d'inhiber ou de réduire l'expression ou l'activité de la calcineurine, pour la préparation d'une composition destinée au traitement des maladies neurodégénératives.
8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que le composé est acide nucléique anti-sens, capable d'inhiber la transcription du gène de la calcineurine ou la traduction du messenger correspondant.

9. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que le composé est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que le composé est choisi parmi le FK506 et la cyclosporine A.

11. Utilisation selon l'une des revendications 7 à 10, pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce des maladies neurodégénératives.

12. Utilisation selon l'une des revendications 7 à 11, pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de la chorée de Huntington ou de l'ischémie cérébrale.

13. Utilisation selon l'une des revendications 7 à 12, pour le traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de l'ALS.

14. Utilisation de la cyclosporine A pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la calcineurine chez les patients atteints d'ALS.

15. Utilisation de FK506 pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la calcineurine chez les patients atteints d'ALS.

16. Polypeptide dérivé de la calcineurine, ledit polypeptide étant dépourvu de domaine auto-inhibiteur fonctionnel.

17. Polypeptide selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID n° 4 ou un fragment de celle-ci comprenant au moins les résidus 441 à 456.

18. Polypeptide comprenant la séquence KLYFGEGGD.

19. Acide nucléique codant un polypeptide selon l'une des revendications 16 à 18.

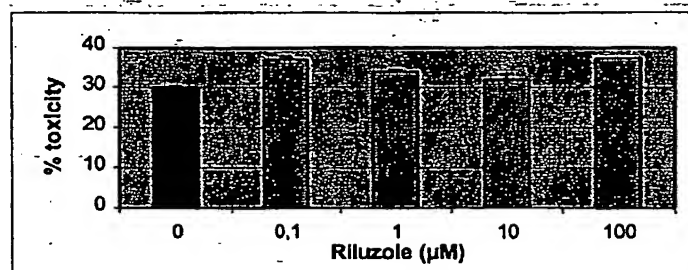
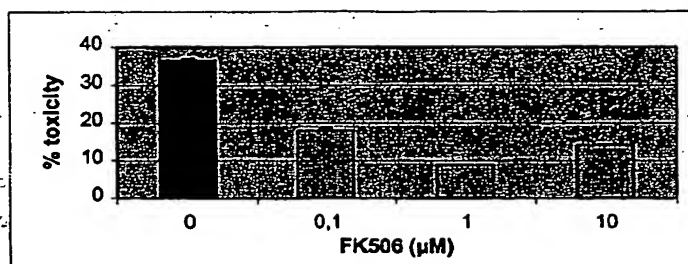
20. Vecteur comprenant un acide nucléique selon la revendication 19.

21. Cellule comprenant un acide nucléique selon la revendication 19 ou un vecteur selon la revendication 20, de préférence d'origine mammifère.

22. Utilisation d'une cellule selon la revendication 21, pour la production d'un polypeptide ou pour le criblage de composés modulant l'activité dudit polypeptide.

1/1

Figure 1



LISTE DE SEQUENCES

<110> EXONHIT THERAPEUTICS

<120> Compositions et méthodes pour le traitement ou la
détection de pathologies neurodégénératives

<130> B0043WO

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2119

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgtccgagc ccaaggcgat tgatcccaag ttgtcgacga ccgacagggt ggtgaaagcc 60
gttccatttc caccaagtca ccggctgaca gcaaaggag tgtttgataa tgatgggaaa 120
cctcgtgtgg atatcttaaa agcacatctc atgaaggagg gcaggctgga agaaagtgtt 180
gcattgagaa taataacaga ggggtgcttcg attctccgac aggaaaaaaa cttgctggat 240
atcgacgcac cagtccacgt ttgtggggac atccatggac aattctttga cttgatgaag 300
ctctttgaag tgggaggatc tcttgccaac actcgctacc tcttcttagg ggactatgtt 360
gacagagggt acttcagtat cgaatgtgtg ctgtatttgt gggccttgaa aattctttac 420
ccaaaacac tgtttttact tcgcggaac catgaatgta ggcaacctac agagtatttc 480
acgttttaac aagaatgtaa aataaagtat tcagaacgag tttatgacgc ctgtatggat 540
gccttcgact gccttccct ggctgcgcta atgaaccagc agttcctgtg tgtacacggt 600
ggtttgctc cagagattaa cactctagat gacatcagaa aattagaccg attcaaagaa 660
ccacctgctt atgggcccat gtgtgacatc ctatggtcag acccctgga ggactttgga 720
aatgagaaga ctcaggaaca ttctactcac aacacagtca gaggctgttc gtacttctac 780
agttacccag ctgtgtgtga ctctctgcag cacaataatt tgttgtccat actccgcgcc 840
cacgaagccc aggatgcagg gtaccgcatg tacaggaaaa gccaaacaac aggcttcccg 900
tctctaatta caatcttctc ggcaccaaatt tacttagatg tgtacaataa caaagctgca 960
gtgttgaagt acgagaacaa tgtgatgaac atcaggcagt tcaactgctc cccgcatccg 1020
tactggctcc caaatttcat ggatgttttc acctggtcgc tgccatttgt tggggagaaa 1080
gtgactgaga tgctggtaaa tgttctcaac atctgctccg acgatgaact ggggtcagaa 1140
gaagatggat ttgacggagc cacggccgca gcccggaagg aagtcatcag aaacaagatc 1200
cgagcaatag gcaaaatggc cagagtgttc tcagttctca gagaagagag tgagagtgtc 1260
ctgacactga agggcctgac cccaactggc atgctcccca gcggagtgtc ctctggcggg 1320
aaacagactc tgcaaagcgc tactgttgag gctattgagg ctgatgaagc catcaaagga 1380
ttttcaccac aacataagat cactagcttc gaggaggcca agggcttaga ccgaattaac 1440
gagaggatgc cacctcgag agacgccatg ccctctgacg ccaaccttaa ctccatcaac 1500
aaggctctcg cctcagagac taacggcacg gacagcaatg gcagtaatag cagcaatatc 1560

cagtgaccac ttctgttca cttttttttt tttttgagct gcagggcatg atgggattgc 1620
 tgcatctcag cagttggatg ttcttgctc tgaaggtagc ttgtttgctc tgggggcccag 1680
 gaattggatt cagtttacac tatcatgaaa aataaaaata aaaaaagagg gagagagata 1740
 ataaactata ttttggtgag ggtggtgatt aaacacctct tttgggtatg cctttaaaaa 1800
 atgcttctag ggcaaaaaag ttttaaaaag aaagctaata ctagctatac tgcaatgtta 1860
 ggggaatgaa cgcgttttcc tactgcactg gggactttta gatagggtta tgaaaggcct 1920
 ttattctgtt actggacacg aaaactttgt ctaatttctt atactctatt gtacctttac 1980
 agtcgcagca ctaaaatgga agacatcaaa catttttaac agaaaaaaa aaagatgtta 2040
 aaactaacta aggactatctt attaatgatg ttttgctact cctgtcagac aatggctata 2100
 aactgaatta ggcagtctt 2119

<210> 2

<211> 521

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Glu Pro Lys Ala Ile Asp Pro Lys Leu Ser Thr Thr Asp Arg
 1 5 10 15

Val Val Lys Ala Val Pro Phe Pro Pro Ser His Arg Leu Thr Ala Lys
 20 25 30

Glu Val Phe Asp Asn Asp Gly Lys Pro Arg Val Asp Ile Leu Lys Ala
 35 40 45

His Leu Met Lys Glu Gly Arg Leu Glu Glu Ser Val Ala Leu Arg Ile
 50 55 60

Ile Thr Glu Gly Ala Ser Ile Leu Arg Gln Glu Lys Asn Leu Leu Asp
 65 70 75 80

Ile Asp Ala Pro Val Thr Val Cys Gly Asp Ile His Gly Gln Phe Phe
 85 90 95

Asp Leu Met Lys Leu Phe Glu Val Gly Gly Ser Pro Ala Asn Thr Arg
 100 105 110

Tyr Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg Gly Tyr Phe Ser Ile Glu
 115 120 125

Cys Val Leu Tyr Leu Trp Ala Leu Lys Ile Leu Tyr Pro Lys Thr Leu
 130 135 140

Phe Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Arg His Leu Thr Glu Tyr Phe
 145 150 155 160

Thr Phe Lys Gln Glu Cys Lys Ile Lys Tyr Ser Glu Arg Val Tyr Asp
165 170 175

Ala Cys Met Asp Ala Phe Asp Cys Leu Pro Leu Ala Ala Leu Met Asn
180 185 190

Gln Gln Phe Leu Cys Val His Gly Gly Leu Ser Pro Glu Ile Asn Thr
195 200 205

Leu Asp Asp Ile Arg Lys Leu Asp Arg Phe Lys Glu Pro Pro Ala Tyr
210 215 220

Gly Pro Met Cys Asp Ile Leu Trp Ser Asp Pro Leu Glu Asp Phe Gly
225 230 235 240

Asn Glu Lys Thr Gln Glu His Phe Thr His Asn Thr Val Arg Gly Cys
245 250 255

Ser Tyr Phe Tyr Ser Tyr Pro Ala Val Cys Asp Phe Leu Gln His Asn
260 265 270

Asn Leu Leu Ser Ile Leu Arg Ala His Glu Ala Gln Asp Ala Gly Tyr
275 280 285

Arg Met Tyr Arg Lys Ser Gln Thr Thr Gly Phe Pro Ser Leu Ile Thr
290 295 300

Ile Phe Ser Ala Pro Asn Tyr Leu Asp Val Tyr Asn Asn Lys Ala Ala
305 310 315 320

Val Leu Lys Tyr Glu Asn Asn Val Met Asn Ile Arg Gln Phe Asn Cys
325 330 335

Ser Pro His Pro Tyr Trp Leu Pro Asn Phe Met Asp Val Phe Thr Trp
340 345 350

Ser Leu Pro Phe Val Gly Glu Lys Val Thr Glu Met Leu Val Asn Val
355 360 365

Leu Asn Ile Cys Ser Asp Asp Glu Leu Gly Ser Glu Glu Asp Gly Phe
370 375 380

Asp Gly Ala Thr Ala Ala Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys Ile
385 390 395 400

Arg Ala Ile Gly Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg Glu Glu
405 410 415

Ser Glu Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly Met Leu
420 425 430

Pro Ser Gly Val Leu Ser Gly Gly Lys Gln Thr Leu Gln Ser Ala Thr
435 440 445

Val Glu Ala Ile Glu Ala Asp Glu Ala Ile Lys Gly Phe Ser Pro Gln
450 455 460

His Lys Ile Thr Ser Phe Glu Glu Ala Lys Gly Leu Asp Arg Ile Asn
465 470 475 480

Glu Arg Met Pro Pro Arg Arg Asp Ala Met Pro Ser Asp Ala Asn Leu
485 490 495

Asn Ser Ile Asn Lys Ala Leu Ala Ser Glu Thr Asn Gly Thr Asp Ser
500 505 510

Asn Gly Ser Asn Ser Ser Asn Ile Gln
515 520

<210> 3

<211> 1718

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1371)

<223> calcineurin variant

<400> 3

atg tcc gag ccc aag gcg att gat ccc aag ttg tcg acg acc gac agg 48

Met Ser Glu Pro Lys Ala Ile Asp Pro Lys Leu Ser Thr Thr Asp Arg

1 5 10 15

gtg gtg aaa gcc gtt cca ttt cca cca agt cac cgg ctg aca gca aag 96

Val Val Lys Ala Val Pro Phe Pro Pro Ser His Arg Leu Thr Ala Lys

20 25 30

gaa gtg ttt gat aat gat ggg aaa cct cgt gtg gat atc tta aaa gca 144

Glu Val Phe Asp Asn Asp Gly Lys Pro Arg Val Asp Ile Leu Lys Ala

35 40 45

cat ctc atg aag gag ggc agg ctg gaa gaa agt gtt gca ttg aga ata 192

His Leu Met Lys Glu Gly Arg Leu Glu Glu Ser Val Ala Leu Arg Ile

50 55 60

ata aca gag ggt gct tcg att ctc cga cag gaa aaa aac ttg ctg gat 240
 Ile Thr Glu Gly Ala Ser Ile Leu Arg Gln Glu Lys Asn Leu Leu Asp
 65 70 75 80

atc gac gca cca gtc aca gtt tgt ggg gac atc cat gga caa ttc ttt 288
 Ile Asp Ala Pro Val Thr Val Cys Gly Asp Ile His Gly Gln Phe Phe
 85 90 95

gac ttg atg aag ctc ttt gaa gtg gga gga tct cct gcc aac act cgc 336
 Asp Leu Met Lys Leu Phe Glu Val Gly Gly Ser Pro Ala Asn Thr Arg
 100 105 110

tac ctc ttc tta ggg gac tat gtt gac aga ggg tac ttc agt atc gaa 384
 Tyr Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg Gly Tyr Phe Ser Ile Glu
 115 120 125

tgt gtg ctg tat ttg tgg gcc ttg aaa att ctt tac ccc aaa aca ctg 432
 Cys Val Leu Tyr Leu Trp Ala Leu Lys Ile Leu Tyr Pro Lys Thr Leu
 130 135 140

ttt tta ctt cgc gga aac cat gaa tgt agg cac ctc aca gag tat ttc 480
 Phe Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Arg His Leu Thr Glu Tyr Phe
 145 150 155 160

acg ttt aaa caa gaa tgt aaa ata aag tat tca gaa cgc gtt tat gac 528
 Thr Phe Lys Gln Glu Cys Lys Ile Lys Tyr Ser Glu Arg Val Tyr Asp
 165 170 175

gcc tgt atg gat gcc ttc gac tgc ctt ccc ctg got gcg cta atg aac 576
 Ala Cys Met Asp Ala Phe Asp Cys Leu Pro Leu Ala Ala Leu Met Asn
 180 185 190

cag cag ttc ctg tgt gta cac ggt ggt ttg tct cca gag att aac act 624
 Gln Gln Phe Leu Cys Val His Gly Gly Leu Ser Pro Glu Ile Asn Thr
 195 200 205

cta gat gac atc aga aaa tta gac cga ttc aaa gaa cca cct gct tat 672
 Leu Asp Asp Ile Arg Lys Leu Asp Arg Phe Lys Glu Pro Pro Ala Tyr
 210 215 220

ggg ccc atg tgt gac atc cta tgg tca gac ccc ctg gag gac ttt gga 720
 Gly Pro Met Cys Asp Ile Leu Trp Ser Asp Pro Leu Glu Asp Phe Gly
 225 230 235 240

aat gag aag act cag gaa cat ttc act cac aac aca gtc aga ggc tgt 768
 Asn Glu Lys Thr Gln Glu His Phe Thr His Asn Thr Val Arg Gly Cys
 245 250 255

tcg tac ttc tac agt tac cca gct gtg tgt gac ttc ctg cag cac aat 816
 Ser Tyr Phe Tyr Ser Tyr Pro Ala Val Cys Asp Phe Leu Gln His Asn
 260 265 270

aat ttg ttg tcc ata ctc cgc gcc cac gaa gcc cag gat gca ggg tac 864
 Asn Leu Leu Ser Ile Leu Arg Ala His Glu Ala Gln Asp Ala Gly Tyr
 275 280 285

cgc atg tac agg aaa agc eaa aca aca ggc ttc ccg tct cta att aca 912
 Arg Met Tyr Arg Lys Ser Gln Thr Thr Gly Phe Pro Ser Leu Ile Thr
 290 295 300

atc ttc tcg gca cca aat tac tta gat gtg tac aat aac aaa gct gca 960
 Ile Phe Ser Ala Pro Asn Tyr Leu Asp Val Tyr Asn Asn Lys Ala Ala
 305 310 315 320

gtg ttg aag tac gag aac aat gtg atg aac atc agg cag ttc aac tgc 1008
 Val Leu Lys Tyr Glu Asn Asn Val Met Asn Ile Arg Gln Phe Asn Cys
 325 330 335

tcc ccg cat ccg tac tgg ctc cca aat ttc atg gat gtt ttc acc tgg 1056
 Ser Pro His Pro Tyr Trp Leu Pro Asn Phe Met Asp Val Phe Thr Trp
 340 345 350

tcg ctg cca ttt gtt ggg gag aaa gtg act gag atg ctg gtc aat gtt 1104
 Ser Leu Pro Phe Val Gly Glu Lys Val Thr Glu Met Leu Val Asn Val
 355 360 365

ctc aac atc tgc tcc gac gat gaa ctg ggg tca gaa gaa gat gga ttt 1152
 Leu Asn Ile Cys Ser Asp Asp Glu Leu Gly Ser Glu Glu Asp Gly Phe
 370 375 380

gac gga gcc acg gcc gca gcc cgg aag gaa gtc atc aga aac aag atc 1200
 Asp Gly Ala Thr Ala Ala Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys Ile
 385 390 395 400

cga gca ata ggc aaa atg gcc aga gtg ttc tca gtt ctc aga gaa gag 1248
 Arg Ala Ile Gly Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg Glu Glu
 405 410 415

agt gag agt gtc ctg aca ctg aag ggc ctg acc cca act ggc atg ctc 1296
 Ser Glu Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly Met Leu
 420 425 430

ccc agc gga gtg ctc tct ggc ggg aaa cag act ctg caa agc gct aaa 1344
 Pro Ser Gly Val Leu Ser Gly Gly Lys Gln Thr Leu Gln Ser Ala Lys
 435 440 445

cta tat ttt ggt gag ggt ggt gat taa acacctcttt tgggtatgcc 1391
 Leu Tyr Phe Gly Glu Gly Gly Asp
 450 455

tttaaaaaat gcttctaggg caaaaaagtt ttaaaaagaa agctaagtct agctatactg 1451

caatgtagg ggaatgaacg cgttttcta ctgcactggg gacttttaga taggttaatg 1511

aaaggccttt attctgttac tggacacgaa aactttgtct aatttcttat actctattgt 1571

acctttacag tcgcagcact aaaatggaag acatcaaaca tttttaacag aaaaaaaaaa 1631

agatgtaaaa actaactaag gactatttat taatgatgtt ttgctactcc tgcagacaaa 1691

ttgctataaa ctgaattagg cagtctt 1718

<210> 4

<211> 456

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Glu Pro Lys Ala Ile Asp Pro Lys Leu Ser Thr Thr Asp Arg

1 5 10 15

Val Val Lys Ala Val Pro Phe Pro Pro Ser His Arg Leu Thr Ala Lys

20 25 30

Glu Val Phe Asp Asn Asp Gly Lys Pro Arg Val Asp Ile Leu Lys Ala

35 40 45

His Leu Met Lys Glu Gly Arg Leu Glu Glu Ser Val Ala Leu Arg Ile

50 55 60

Ile Thr Glu Gly Ala Ser Ile Leu Arg Gln Glu Lys Asn Leu Leu Asp

65 70 75 80

Ile Asp Ala Pro Val Thr Val Cys Gly Asp Ile His Gly Gln Phe Phe

85 90 95

Asp Leu Met Lys Leu Phe Glu Val Gly Gly Ser Pro Ala Asn Thr Arg

100 105 110

Tyr Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg Gly Tyr Phe Ser Ile Glu

115 120 125

Cys Val Leu Tyr Leu Trp Ala Leu Lys Ile Leu Tyr Pro Lys Thr Leu

130 135 140

Phe Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Arg His Leu Thr Glu Tyr Phe

145 150 155 160

Thr Phe Lys Gln Glu Cys Lys Ile Lys Tyr Ser Glu Arg Val Tyr Asp

165 170 175

Ala Cys Met Asp Ala Phe Asp Cys Leu Pro Leu Ala Ala Leu Met Asn

180 185 190

Gln Gln Phe Leu Cys Val His Gly Gly Leu Ser Pro Glu Ile Asn Thr
 195 200 205
 Leu Asp Asp Ile Arg Lys Leu Asp Arg Phe Lys Glu Pro Pro Ala Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Met Cys Asp Ile Leu Trp Ser Asp Pro Leu Glu Asp Phe Gly
 225 230 235 240
 Asn Glu Lys Thr Gln Glu His Phe Thr His Asn Thr Val Arg Gly Cys
 245 250 255
 Ser Tyr Phe Tyr Ser Tyr Pro Ala Val Cys Asp Phe Leu Gln His Asn
 260 265 270
 Asn Leu Leu Ser Ile Leu Arg Ala His Glu Ala Gln Asp Ala Gly Tyr
 275 280 285
 Arg Met Tyr Arg Lys Ser Gln Thr Thr Gly Phe Pro Ser Leu Ile Thr
 290 295 300
 Ile Phe Ser Ala Pro Asn Tyr Leu Asp Val Tyr Asn Asn Lys Ala Ala
 305 310 315 320
 Val Leu Lys Tyr Glu Asn Asn Val Met Asn Ile Arg Gln Phe Asn Cys
 325 330 335
 Ser Pro His Pro Tyr Trp Leu Pro Asn Phe Met Asp Val Phe Thr Trp
 340 345 350
 Ser Leu Pro Phe Val Gly Glu Lys Val Thr Glu Met Leu Val Asn Val
 355 360 365
 Leu Asn Ile Cys Ser Asp Asp Glu Leu Gly Ser Glu Glu Asp Gly Phe
 370 375 380
 Asp Gly Ala Thr Ala Ala Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys Ile
 385 390 395 400
 Arg Ala Ile Gly Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg Glu Glu
 405 410 415
 Ser Glu Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly Met Leu
 420 425 430
 Pro Ser Gly Val Leu Ser Gly Gly Lys Gln Thr Leu Gln Ser Ala Lys
 435 440 445
 Leu Tyr Phe Gly Glu Gly Gly Asp
 450 455

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.